

⑫ 公開特許公報(A) 平4-88985

⑤Int. Cl.⁵
C 12 N 15/37識別記号
ZNA

庁内整理番号

8717-4B C 12 N 15/00

⑬公開 平成4年(1992)3月23日

A

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全7頁)

⑭発明の名称 ヒトパルボウイルス構造蛋白質遺伝子

⑯特 願 平2-202827

⑰出 願 平2(1990)7月31日

⑱発明者 菅 村 和 夫 宮城県仙台市青葉区旭ヶ丘1-27-8
 ⑱発明者 白 石 広 行 宮城県仙台市宮城野区鶴ヶ谷北1-18-10
 ⑱発明者 平 山 孝 一 郎 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社
 総合研究所内
 ⑱発明者 関 誠 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社
 総合研究所内
 ⑱発明者 石 井 健 久 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社
 総合研究所内
 ⑲出 願 人 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号
 ⑲代 理 人 弁理士 長谷川 一 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

ヒトパルボウイルス構造蛋白質遺伝子

2. 特許請求の範囲

(1) 下記式(1)～式(3)で表される部分塩基配列を有するヒトパルボウイルス構造蛋白質VP-1遺伝子。

式(1)

AAATGGTGGG AAAGTGATGA
 TAAATTTGCT AAAACTGTGT
 ATCAGCAATT TGTGGAATTT
 TATGAAAAGA TTACGGGAAC
 AGACTTAGAG CTTATTCAAA
 TATNAAAAGA TCATTATAAT
 A

式(2)

AGAAGCCAGC ACTGGTGCAAG
 GAGGGGGGGG CAGTAATCCT
 GTCAAAAGCA TGTGCACTGA
 GGGGGCCACT TTTAGTGCCA

ACTCTGTAAC TTGTACATTT
 TCCAGACAGT TTTTAATTCC
 ATATGACCCA GAGCACCATTT
 ATAAGGTGTT TTCTCCCNTA
 GCAAGTAGCT GCCACAATGC
 CAGTGGAAAG GAGGCCAAAGG
 TTTGCACCAT TAGTCCCATTA
 AT

式(3)

AGATGACAGT TTTAAAACTC
 AGTTTGCAGC CTTAGGAGGA
 TGGGGTTTGC ATCAGCCACC
 TCCTCAAATA TTTTGTGAAAA
 TATTACCACA AAGTGCGCCA
 ATTGAAGGTA TTAAATCAAT
 GGGGAATTACT ACCTTAGTTTC
 AGTATGCTGT GGGGAATTATG
 ACAGTAACTA TGACATTTTAA
 ATTGGGGGCC CGTAAAGCTA
 CGGGACGGTG GAATCCTCAA

CCTGGAGTAT ATCCCCCGCA
CGCAGCAGGT CATTTACCAT
ATGTACTATA TGACCCCAACA
GCTACAGATG CAAAACAACN
CCACAGACAT GGATATGAAA
AGCCTGAAGA ATTGTGGACA
GCCAAAAGTC GTGTGCACCC
ATTGTAAACA CTCCCCACCG
TGC

(上記式中、Nは構造未決定の塩基を表す。)

(2) 下記式(2)又は式(3)で表される部分塩基配列を有するヒトパルボウイルス構造蛋白質VP-2遺伝子。

式(2)

AGAAGCCAGC ACTGGTGCA
GAGGGGGGGG CAGTAATCCT
GTCAAAAGCA TGTGCAGTGA
GGGGGCCACT TTTAGTGCCA
ACTCTGTAAAC TTGTACATTT
TCCAGACAGT TTTTAATTCC

ATGTACTATA TGACCCCAACA
GCTACAGATG CAAAACAACN
CCACAGACAT GGATATGAAA
AGCCTGAAGA ATTGTGGACA
GCCAAAAGTC GTGTGCACCC
ATTGTAAACA CTCCCCACCG
TGC

(上記式中、Nは構造未決定の塩基を表す。)

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、流産、胎児水腫、肝障害、出血熱、関節炎やリュウマチなど種々の疾患の病因に係わる新規なヒトパルボウイルス構造蛋白質遺伝子に関する。

〔従来の技術及び発明が解決しようとする問題点〕

パルボウイルスの仲間、一本鎖の直鎖DNAゲノムを有する最小のウイルス群(Parvoviridae科)に属する。Parvoviridae科ウイルスを電子顕微鏡で見ると、その粒子は球状で、正二十面体様対称性を示し、32個のキャプソメア(capsomere)から成る。直径約20~25nmの極めて小型のウイルスで、エンベロープを保有せず、熱、乾燥、脂質溶剤、洗剤などに比較的耐性のウイルスである(Intervirology, 23, 61-73(1985))。脊椎動物に感染するパルボウイルスの宿主には、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウス、ミンク、イタチ、ガチョウ及びヒトが含まれるが、一般に病原性は似ているものの、これらのウイルス間で免疫学的な交叉性は見出されていない。従って、ヒトパルボウイルスの診断やワクチンの開発に使用可能なウイルス抗原は、ヒトパルボウイルス由来のものであることが重要な条件となる。

ATATGACCCA GAGCACCAT
ATAAGGTGTT TTCTCCCN
GCAAGTAGCT GCCACAATGC
CAGTGGAAAG GAGGCCAAAG
TTTGCACCAT TAGTCCCAT
AT

式(3)

AGATGACAGT TTTAAAACTC
AGTTTGCAGC CTTAGGAGGA
TGGGGTTTGC ATCAGCCACC
TCCTCAATA TTTTGTGAAA
TATTACCACA AAGTGCGCCA
ATTGAAGGTA TTAAATCAAT
GGGAATTACT ACCTTAGTTT
AGTATGCTGT GGGAAATTATG
ACAGTAACTA TGACATTTAA
ATTGGGGGCC CGTAAAGCTA
CGGGACGGTG GAATCCTCAA
CCTGGAGTAT ATCCCCCGCA
CGCAGCAGGT CATTTACCAT

idae科)に属する。Parvoviridae科ウイルスを電子顕微鏡で見ると、その粒子は球状で、正二十面体様対称性を示し、32個のキャプソメア(capsomere)から成る。直径約20~25nmの極めて小型のウイルスで、エンベロープを保有せず、熱、乾燥、脂質溶剤、洗剤などに比較的耐性のウイルスである(Intervirology, 23, 61-73(1985))。脊椎動物に感染するパルボウイルスの宿主には、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウス、ミンク、イタチ、ガチョウ及びヒトが含まれるが、一般に病原性は似ているものの、これらのウイルス間で免疫学的な交叉性は見出されていない。従って、ヒトパルボウイルスの診断やワクチンの開発に使用可能なウイルス抗原は、ヒトパルボウイルス由来のものであることが重要な条件となる。

ヒトパルボウイルスは、1975年に初めてその存在が知られた(Lancet, i, 72-73, (1975))が、病原性は不明であった。その後、遺伝性溶血性疾患を有する個体に、劇症の再生不良

性貧血を引き起こすことが知られ〔Lancet, i, 664-665(1981)〕、小児に流行する伝染性紅斑症の病因ウイルスとして確かなものとなった〔Lancet, i, 1378, (1983)〕。更に、健康成人においても、現在までのところ、発熱、不定の発疹症、出血熱様疾患、肝障害、関節炎、流産や胎児水腫などの原因となることが知られている〔医学のあゆみ, 142, 530-532(1987)〕。また、リュウマチへの関与も推定されている〔第36回日本ウイルス学会抄録, 328(1988)〕。

以上のように、ヒトパルボウイルスは、臨床極めて興味深いウイルスであるといえる。しかしながら、ウイルス抗原の取得が困難であるため、診断系の一般化が遅れており、血液のスクリーニングや臨床検査が容易に行えないのが現状である。

ヒトパルボウイルスの個体への侵入経路は、輸血と鼻腔が知られ、その標的細胞は極く限られた赤芽球の前駆細胞である〔Nature, 302, 426-429(1983)〕。ヒトパルボウイルスが体内に

は、有用かつ大量のウイルス抗原の取得が重要である。

一般に、診断、医薬応用のためのウイルス抗原の取得方法は、in vitroでウイルスを感染・増殖させる方法、もしくは、ウイルス遺伝子をクローニングして、抗原蛋白を大量に発現させる方法に大別される。in vitro感染系は、特殊な遺伝的疾患患者の骨髓細胞を用いた報告例がある〔Blood, 70, 384-391(1987)〕が、ウイルスの回収率は極めて低く、また、通常の骨髓中にはウイルス標的細胞が極めて少ないため、骨髓細胞を用いたin vitro感染系はその使用範囲に制限がある。多くの株化細胞も、ヒトパルボウイルスに対する感受性を消失していた。最近、株化細胞の1つに感染性が確認されたが、この系ではウイルスの増殖は極めて低い〔臨床と微生物, 16, 177-186(1989)〕。

本発明者らは、先に胎児肝組織由来の赤芽球細胞を用いたin vitroのヒトパルボウイルス増殖方法を報告している〔特開昭63-242166号〕

侵入した場合、血中のウイルスの増殖は、一般に感染後6～12日の不顕性期に観察され、症状が現れてからのウイルス抗原の検出は困難である。従って、ヒトパルボウイルス感染の証明は、ウイルス抗原そのものではなく、血清中に抗ヒトパルボウイルス抗体を検出することによって行われている。

ヒトパルボウイルス診断系は、現在、献血検体およそ2万例に1例の割合で発見されるウイルス血症の血清より、ウイルス粒子を精製し、それを抗原として、免疫電気向流法〔医学のあゆみ, 135, 317-318(1985)〕及びエンザイムイムノアッセイ法〔医学のあゆみ, 134, 909-910(1985)〕やラジオイムノアッセイ法〔感染症学雑誌, 58, 1213-1220(1985)〕が極く限られた範囲内で行われているにすぎない。しかも、免疫電気向流法は検出感度が低く、さらに広範な検査のためには、いずれの方法においてもウイルス抗原量が不足している。このような状況から、ヒトパルボウイルスの診断系の開発のために

この方法は、in vitroでヒトパルボウイルスを増殖させるのに有力な方法であるが、原料の入手の点でやや難点があり、広く利用するためには必ずしも十分ではなかった。

遺伝子組換え法によってウイルス抗原を取得する為には、ヒトパルボウイルス遺伝子が必要である。現在、ヒトパルボウイルスに感染した鎌形赤血球貧血患者血清由来のヒトパルボウイルスB19株遺伝子の全配列が報告されている〔J. Virol. 58, 921-936(1986)〕。この遺伝子産物の解析から、ウイルス構造蛋白質としてウイルス粒子に存在するのは、VP-1(分子量約84KDa)及びVP-2(分子量約58KDa)の2種類の蛋白質のみであり、また、精製ヒトパルボウイルス粒子と患者血清との反応性から、ヒトパルボウイルスに感染した宿主がこれらVP-1及びVP-2を標的として抗原抗体反応を惹起することが確かめられている〔J. Virol. 61, 2627(1987)〕。更にまた、VP-2遺伝子の蛋白コード領域は、VP-1遺伝子の

内部に完全に含まれていることも確認されており、従って、診断系の抗原として、VP-1及びVP-2抗原はどちらも好適な部分抗原であるといえる。

(問題点を解決するための手段)

そこで、本発明者らは、ヒトパルボウイルス遺伝子を得るべく鋭意検討したところ、従来公知のヒトパルボウイルス遺伝子と、アミノ酸レベル及びDNAレベルで幾つか構造の異なる新規な、診断系の開発に有用なヒトパルボウイルス遺伝子を見出し本発明を完成するに至った。

即ち、本発明の要旨は、下記式(1)～式(3)で表される部分塩基配列を有するヒトパルボウイルス構造蛋白質VP-1遺伝子及び下記式(2)～式(3)で表される部分塩基配列を有するヒトパルボウイルス構造蛋白質VP-2遺伝子に存する。

式(1)

~~AAATGGGTGGG AAAGTGATGA~~
~~TAAATTTGCT AAAACTGTGT~~

式(3)

AGATGACAGT TTTAAAACTC
AGTTTTCAGC CTTAGGAGGA
TGGGGTTTGC ATCAGCCACC
TCCTCAAATA TTTTGTGAAAA
TATTACCACA AAGTGCGCCA
ATTGAAGGTA TTAAATCAAT
GGGAATTACT ACCTTAGTTTC
AGTATGCTGT GGGAAATATG
ACAGTAACTA TGACATTTAA
ATTGGGGGCC CGTAAAGCTA
CGGGACGGTG GAATCCTCAA
CCTGGAGTAT ATCCCCCGCA
CGCAGCAGGT CATTTACCAT
ATGTACTATA TGACCCCAACA
GCTACAGATG CAAAACAACN
CCACAGACAT GGATATGAAA
AGCCTGAAGA ATTGTGGACA
GCCAAAAGTC GTGTGCACCC
ATTGTAAACA CTCCCCAACC

AAATGGGTGGG AAAGTGATGA
TAAATTTGCT AAAACTGTGT
ATCAGCAATT TGTGGAATTT
TATGAAAAGA TTACGGGAAC
AGACTTAGAG CTTATTCAAA
TATNAAAAGA TCATTATAAT
A

式(2)

AGAAGCCAGC ACTGGTGCAG
GAGGGGGGGG CAGTAATCCT
GTCAAAGCA TGTGCAGTGA
GGGGGCCACT TTTAGTGCCA
ACTCTGTAACT TTGTACATTT
TCCAGACAGT TTTTAATTCC
ATATGACCCA GAGCACCAT
ATAAGGTGTT TTCTCCCNAT
GCAAGTAGCT GCCACAATGC
CAGTGGAAAG GAGGCCAAAG
TTTGCACCAT TAGTCCCAT
AT

TGC

(上記式中、Nは構造未決定の塩基を表す。)

以下に本発明を説明する。

本発明のヒトパルボウイルス構造蛋白質遺伝子は、分子量約84KDaのVP-1遺伝子と分子量約58KDaのVP-2遺伝子の2種類で、VP-2遺伝子はVP-1遺伝子の領域内に含まれている。

VP-1遺伝子は、前記式(1)、式(2)及び式(3)で表される部分塩基配列を含み、VP-2遺伝子は、前記式(2)及び式(3)で表される部分塩基配列を含む。

本発明のヒトパルボウイルス構造蛋白質遺伝子をクローニングするための材料としては、例えば、小児の伝染性紅斑症(EI)の原因ウイルスに感染した成人患者急性期血清等が挙げられる。

このような血清中のウイルス粒子を、例えば、サッカロース密度勾配遠心によって沈殿させて精製し、得られるウイルス粒子から常法に従

ってヒトパルボウイルスDNAを抽出・精製して、クローニングに供する。

クローニングは、ヒトパルボウイルスB19株の遺伝子配列〔J. Virol. 58, 921-936(1986)〕に基づき合成したDNAをプライマーとして使用して、ポリメラーゼ連鎖反応法〔PCR法: Nature, 324, 163(1986)〕によって目的とするヒトパルボウイルス構造蛋白質遺伝子を増幅することができる。

具体的には、例えば、精製したヒトパルボウイルスDNAに、該遺伝子の部分配列からなるDNAプライマーと該遺伝子に相補的な部分配列からなるDNAプライマーの2種のDNAプライマーをアニーリングさせ、常法に従って、該DNAプライマー間のDNAを増幅させる。

得られた各DNA断片を、クローニングベクター、例えば、pUC19(東洋紡社製)等に組み込んでクローニングし、得られるクローンからプラスミドDNAを抽出し、該ベクターに組み込まれているDNA配列をジデオキシ法等

により決定することにより、目的とするヒトパルボウイルス構造蛋白質遺伝子の全塩基配列を決めることができる。

本発明によれば、VP-1遺伝子は、前記式(1)、式(2)及び式(3)で表される部分塩基配列を有しており、また、VP-2遺伝子は、前記式(2)及び式(3)で表される部分塩基配列を有していることが判った。

これら式(1)～式(3)で表される塩基配列中、塩基レベルで12個所、アミノ酸レベルで6個所が、公知のヒトパルボウイルスB19株の配列と異なっていた。

(発明の効果)

本発明のヒトパルボウイルス構造蛋白質遺伝子は、その全配列或いはPCR法で得られるDNA断片を公知の発現ベクターに導入し、該発現ベクターで形質転換した宿主細胞内で発現させることにより、ラジオイムノアッセイ法、エンザイムイムノアッセイ法等の診断に使用し得る組換え抗原を得ることができる。

これを75mM NaCl—25mM EDTA水溶液(pH 8.0)に懸濁後、終濃度1%となるようにドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を、また、0.1mg/ml プロテイナーゼKを加えて56℃にて1時間以上加熱してDNAを熱変性させた。

この懸濁液中の変性DNAを常法に従い、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿によりヒトパルボウイルスのDNAを精製した。このDNAは10μlの水に溶解した。

(II) ヒトパルボウイルス構造蛋白質遺伝子のクローニング

上記(I)で得たDNA試料1μlを用いて、Saikiらの方法〔Nature, 324, 163, (1986)〕に準じてPCR法によってパルボウイルス遺伝子を増幅した。PCR法は宝酒造社製タカラ Gene Amp™ DNA キットを用い、その説明書に従って行った。

即ち、50mM KCl、10mM Tris-HCl pH 8.3、1.5mM MgCl₂、

(実施例)

以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明する。

実施例1

(I) ヒトパルボウイルス構造蛋白質遺伝子の調製

小児の伝染性紅斑(E1)の流行期に該原因ウイルスに感染した成人から血清を採取した。エンザイムイムノアッセイ法及びDNAハイブリダイゼーション法にてヒトパルボウイルス血症を確認できた血清を選び、ヒトパルボウイルス構造蛋白質遺伝子の材料とした。

ウイルスDNA量が約10μg/mlの上記血清1mlを、リン酸緩衝生理食塩水(PBS) pH 7.4にて2倍に希釈し、12,000rpm、60分間遠心した上清を、30%サッカロース水溶液2ml上に重層した。

これを日立超遠心機(ローターRPS-56T)で4℃にて35,000rpm、15時間遠心してウイルス粒子を沈殿として回収した。

0.1% (W/V) ゼラチンを含む反応液中で、ヒトパルボウイルスDNA試料1 μ lに第1図に示した6種類の合成DNAプライマーから第2図に示した組合せの2種を選び、それぞれ100 pmoleをアニーリングさせ、増幅反応を行った。ポリメラーゼ連鎖反応は終容量100 μ lの反応液中で、Taqポリメラーゼ非存在下で95℃、5分間反応後、Taqポリメラーゼ存在下で95℃、1分—30~37℃、1分—72℃、1分のサイクルで増幅反応を35サイクル行ったのち、さらに72℃、7分間反応させた。

上記方法によって、第2図に示した4個のDNA断片を得た。

これらDNA断片は、さらにT₄ポリメラーゼで平滑末端化し、ポリヌクレオチドキナーゼで5'末端にリン酸基を導入後、pUC19クローニングベクターに組み込み、大腸菌を形質転換し、形質転換体を培養してそれぞれ約100個以上のクローンを得た。

異なる部分に=印を付した。

出願人 三菱化成株式会社

代理人 弁理士 長谷川 一 ほか1名

得られたクローンからDNAを常法により調製し、デュボン社製蛍光シーケンサーGENESIS 2000を用いて各DNA断片の部分塩基配列を決定した。その配列を第3図に示した。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、実施例で使用した6種類の合成DNAプライマー(ON1~ON6)の塩基配列(5'→3')を表す。

第2図は、実施例で使用した6種類の合成DNAプライマー(ON1~ON6)及びクローニングした4種のヒトパルボウイルスのDNA断片のVP-1遺伝子及びVP-2遺伝子に対する位置を示す。図中の塩基配列番号は、ヒトパルボウイルスB19株の塩基配列番号に合わせた。また、各DNA断片における←→は、第3図に示した塩基配列のDNAの位置を示す。

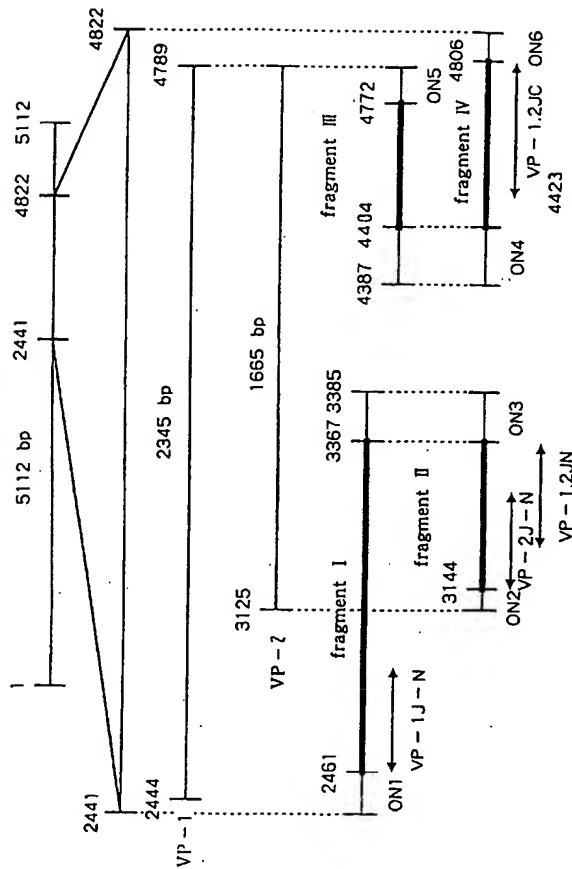
第3図は、実施例で決定した4種のDNA断片の部分塩基配列を表す。図中、B19株の遺伝子と異なる塩基に=印を、また、アミノ酸が

第1図

```

ON1: GGT CGACAAGCTTATGA
      GTAAAAAAGTGGC
ON2: GGT CGACAAGCTTATGA
      CTTCA GTTAATTCTGC
ON3: GGCTGACCCATGGGGTT
      GAGTATCCC
ON4: CTATGAAAGCCAGCTGT
      G
ON5: TTACAATGGGTGCCAC
ON6: ACGCATCCTGGCTGAGG
  
```

第2図



第3図 (その1)

VP-1J-N (121bp):

| | |
|--------------------|----------------------|
| AAATGCTGGC | AAAGTGATGA |
| TAAATTTGCT | AAA <u>A</u> CTGTGT |
| ATCAGCAATT | TGTGGAAATTT |
| TATCAAAAG <u>A</u> | TTAC <u>G</u> GGAAAC |
| AGACTTAGAG | CTTATTCAAA |
| TATNAAAAGA | TCATTATAAT |
| A | |

VP-2J-N (145bp):

| | |
|-------------|---------------------|
| AGAAAGCCAGC | ACTGGTGCAG |
| GAGGGGGGGG | CAGTAAT <u>C</u> CT |
| GTCAAAAGCA | TGTGCAGTGA |
| GGGGGCCACT | TTTAGTG <u>C</u> CA |
| ACTCTGTAAAC | TTGTACATTT |
| TCCAGACAGT | TTTTAATTCC |
| ATATGACCCA | GAGCACCATTT |
| ATAAG | |

VP-1.2JN (140bp):

| | |
|------------|------------|
| TCTGTAACTT | GTACATTTTC |
|------------|------------|

第3図 (その2)

| | |
|---------------------|---------------------|
| CAGACAGTTT | TTAATTCCAT |
| ATGACCCAGA | GCACCATTAT |
| AAGGTGTTTT | CTCCCN <u>T</u> AGC |
| <u>A</u> AGTAGCTGC | CACAATGCCA |
| GTGGAAAGGA | GGCAAAGGTT |
| TGCACCAT <u>T</u> A | GTCCCATAAAT |

VP-1.2JC (383bp):

| | |
|---------------------|----------------------|
| AGATGACAGT | TTTAAAACTC |
| AGTTTGCAGC | CTTAGGAGGA |
| TGGGGTTTGC | ATCAGCCACC |
| TCCTCAAATA | TTTTTT <u>G</u> AAAA |
| TATTACCACA | AAGTG <u>C</u> GCCA |
| ATTG <u>A</u> AGGTA | TTAAATCAAT |
| GGGAATTACT | ACCTTAGTTC |
| AGTATGCTGT | GGGAATTATG |
| ACAGTAACTA | TGACATTTAA |
| ATTGGGGCCC | CGTAAAGCTA |
| CGGGACGGTG | GAATCCTCAA |
| CCTGGAGTAT | ATCCCCCGCA |

第3図 (その3)

| | |
|---------------------|-------------|
| CGCAGCAGGT | CATTTACCAT |
| ATGTACTATA | TGACCCCAACA |
| GCTACAGATG | CAAAACAACN |
| CCACAGACAT | GGATATGAAA |
| AGCCTGAAGA | ATTGTGGACA |
| GCCAAAAG <u>T</u> C | GTGTGCACCC |
| ATTGTAAACA | CTCCCCACCG |
| TGC | |